

## VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP00/06404 is a true and complete translation of the above identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 9th day of May, 2001

Full name of the translator: Reiko IZUMIYA

Signature of the translator:



Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,  
New Ohtemachi Bldg., 2-1,  
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo, JAPAN

**PCT REQUEST**

<b>0</b>	<b>For receiving Office use only</b>	
<b>0-1</b>	International Application No.	
<b>0-2</b>	International Filing Date	20.9.00
<b>0-3</b>	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
<b>0-4</b>	<b>Form - PCT/RO/101 PCT Request</b>	
<b>0-4-1</b>	Prepared using	<b>PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)</b>
<b>0-5</b>	<b>Petition</b> The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
<b>0-6</b>	<b>Receiving Office (specified by the applicant)</b>	<b>Japanese Patent Office (RO/JP)</b>
<b>0-7</b>	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	<b>YCT-517</b>
<b>I</b>	<b>Title of invention</b>	<b>A NOVEL PROTEIN, A GENE CODING THEREFOR AND A METHOD OF USING THE SAME</b>
<b>II</b>	<b>Applicant</b>	
<b>II-1</b>	This person is:	<b>applicant only</b>
<b>II-2</b>	Applicant for	<b>all designated States except US</b>
<b>II-4</b>	Name	<b>JAPAN TOBACCO INC.</b>
<b>II-5</b>	Address:	<b>2-1, Toranomon 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan</b>
<b>II-6</b>	State of nationality	<b>JP</b>
<b>II-7</b>	State of residence	<b>JP</b>
<b>III-1</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
<b>III-1-1</b>	This person is:	<b>applicant only</b>
<b>III-1-2</b>	Applicant for	<b>all designated States except US</b>
<b>III-1-4</b>	Name	<b>CORPORATE JURIDICAL PERSON, SOCIETY FOR TECHNO-INNOVATION OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES</b>
<b>III-1-5</b>	Address:	<b>9-13, Akasaka 1-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan</b>
<b>III-1-6</b>	State of nationality	<b>JP</b>
<b>III-1-7</b>	State of residence	<b>JP</b>

## PCT REQUEST

<b>III-2</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-2-1	This person is:	<b>applicant and inventor</b>
III-2-2	Applicant for	<b>US only</b>
III-2-4	Name (LAST, First)	<b>TAKAKURA, Yoshimitsu</b>
III-2-5	Address:	<b>c/o Orynova K.K. 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan</b>
III-2-6	State of nationality	<b>JP</b>
III-2-7	State of residence	<b>JP</b>
<b>III-3</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-3-1	This person is:	<b>applicant and inventor</b>
III-3-2	Applicant for	<b>US only</b>
III-3-4	Name (LAST, First)	<b>KUWATA, Shigeru</b>
III-3-5	Address:	<b>c/o Orynova K.K. 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan</b>
III-3-6	State of nationality	<b>JP</b>
III-3-7	State of residence	<b>JP</b>
<b>III-4</b>	<b>Applicant and/or inventor</b>	
III-4-1	This person is:	<b>applicant and inventor</b>
III-4-2	Applicant for	<b>US only</b>
III-4-4	Name (LAST, First)	<b>INOUE, Yasuhiro</b>
III-4-5	Address:	<b>c/o Orynova K.K. 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan</b>
III-4-6	State of nationality	<b>JP</b>
III-4-7	State of residence	<b>JP</b>
<b>IV-1</b>	<b>Agent or common representative; or address for correspondence</b> The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	<b>agent</b>
IV-1-1	Name (LAST, First)	<b>SHAMOTO , Ichio</b>
IV-1-2	Address:	<b>YUASA and HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg., 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan</b>
IV-1-3	Telephone No.	<b>03-3270-6641</b>
IV-1-4	Facsimile No.	<b>03-3246-0233</b>
IV-1-5	e-mail	<b>yulawpat@yuasa-hara.co.jp</b>

## PCT REQUEST

IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent	
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KOBAYASHI, Yasushi; TOMITA, Hiroyuki; IZUMIYA, Reiko	
V	Designation of States		
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT	
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AU CA CN JP KR US	
V-5	Precautionary Designation Statement  In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	21 September 1999 (21.09.1999)	
VI-1-2	Number	267238/1999	
VI-1-3	Country	JP	
VI-2	Priority document request  The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	5	-
VIII-2	Description (excluding sequence listing part)	31	-
VIII-3	Claims	3	-
VIII-4	Abstract	1	-
VIII-5	Drawings	2	-
VIII-6	Sequence listing part of description	12	-
VIII-7	TOTAL	54	

## PCT REQUEST

YCT-517

	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-15	Nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	<b>diskette</b>
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the International application	<b>Japanese</b>	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name (LAST, First)	<b>SHAMOTO , Ichio</b> (seal)	
IX-2	Signature of applicant or agent		
IX-2-1	Name (LAST, First)	<b>IMAI , Shosuke</b> (seal)	
IX-3	Signature of applicant or agent		
IX-3-1	Name (LAST, First)	<b>MASUI , Chuji</b> (seal)	
IX-4	Signature of applicant or agent		
IX-4-1	Name (LAST, First)	<b>KOBAYASHI , Yasushi</b> (seal)	
IX-5	Signature of applicant or agent		
IX-5-1	Name (LAST, First)	<b>TOMITA , Hiroyuki</b> (seal)	
IX-6	Signature of applicant or agent		
IX-6-1	Name (LAST, First)	<b>IZUMIYA , Reiko</b> (seal)	

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	<b>ISA/JP</b>
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

## PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-517	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06404	国際出願日 (日.月.年) 20.09.00	優先日 (日.月.年) 21.09.99
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 14/375, C12N 15/31, 15/63, 1/21, C12Q 1/68, C12P 21/02, A01N 65/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 14/00-14/825, C12N 15/00-15/90, C12N 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	US, 5712139, A (Kikkoman Corporation) 27. 1月. 1998 (27. 01. 98) & JP, 8-205861, A & DE, 19545780, A1	<u>19</u> 1-18, 20-27
A	JP, 10-313876, A (農林水産省食品総合研究所長) 2. 12月. 1998 (02. 12. 98) (ファミリーなし)	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5302699, A (Director of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries) 12. 4月. 1994 (12. 04. 94) & JP, 6-80699, A	1-27
A	OITA, S. et al. "Purification and Properties of a New Chitin-bi nding Antifungal CB-1 from <i>Bacillus licheniformis</i> .", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (1996, Mar.) Vol. 60, No. 3, p. 481-483	1-27



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/21657 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/375, C12N 15/31, 15/63,  
I/21, C12Q 1/68, C12P 21/02, A01N 65/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06404

(22) 国際出願日: 2000年9月20日 (20.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/267238 1999年9月21日 (21.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP). 社団法人 農林水産先端技術産業振興センター (CORPORATE JURIDICAL PERSON, SOCIETY FOR TECHNO-INNOVATION OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES) [JP/JP]; 〒107-0052 東京都港区赤坂一丁目9番13号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高倉由光 (TAKAKURA, Yoshimitsu) [JP/JP]. 桑田 茂 (KUWATA, Shigeru) [JP/JP]. 井上康宏 (INOUE, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会社 オリノバ内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEIN, GENE ENCODING THE SAME AND METHOD OF UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらの利用法

(57) Abstract: Attempts are made to find out and identify a novel antibacterial protein whereby the growth of plant pathogenic bacteria, for example, *Pyricularia oryzae* and *Rhizoctonia solani*, which are causative of the two major diseases of rice, can be inhibited at a relatively low concentration, and to clone the gene of this protein. Thus, an antibacterial protein, which can be obtained from a fraction prepared by extracting *Lyophyllum shimeji* with water and subjecting the extract to ammonium sulfate precipitation, exerts an antibacterial activity at least on *Pyricularia oryzae* or *Rhizoctonia solani*, and contains components of about 70 kDa and/or about 65 kDa in molecular weight when determined by the SDS-PAGE method, is provided.

(57) 要約:

本発明は、比較的低濃度でイネの2大病害であるいもち病菌や紋枯病菌などの植物病原菌の生長を抑止できる新規な抗菌タンパク質を検索、同定し、さらに当該タンパク質の遺伝子をクローニングすることを目的とする。本発明によれば、ホンシメジの水溶性抽出液から硫酸沈殿法で沈殿する画分から得ることができ、少なくともイネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を有し、SDS-PAGE法で分子量が約70 kDaおよび/または約65 kDaの成分の存在を示す、抗菌タンパク質、および当該タンパク質をコードする遺伝子並びにそれらの利用法が提供される。

WO 01/21657 A1

## 明細書

新規タンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらの利用法

## 技術分野

- 5 本発明は、抗菌活性を有する新規なタンパク質、上記タンパク質をコードする遺伝子、並びに上記タンパク質および上記遺伝子の利用法に関する。さらに詳細には、本発明は、少なくともイネ紋枯病菌およびイネいもち病菌に対する抗菌活性を有するホンシメジ由来タンパク質、上記タンパク質をコードする遺伝子、並びに上記タンパク質および上記遺伝子の利用法に関する。
- 10 本出願は、1999年9月21日に提出された日本特許出願 特願平11-267238号を基礎とする優先権主張出願である。当該日本特許出願の内容は全て本明細書に援用される。

## 背景技術

- 15 植物病原菌に対して抗真菌活性あるいは抗菌活性を有する植物のタンパク質としては、キチナーゼ、 $\beta$ -1, 3-グルカナーゼなどの溶菌酵素が従来から知られている。In vitro実験では、これらの酵素は単独でも効果があるが (Schlumbaum他(1986), Nature 324, p. 365-367; Broglie他(1991), Science 254, p. 1194-1197)、一般には2種類以上の酵素を組み合わせることで、より高い効果が得られることが知られている (Mauch他(1988), Plant Physiol. 88, p. 936-942; Sela-Buurlage他(1993), Plant Physiol. 101, p. 857-863)。これら溶菌酵素が糸状菌の生育を抑制する濃度は一般的には、単独の場合
- 20 25 数十~数百 $\mu$ g/ml程度、組み合わせの場合でも各々の酵素当たり数 $\mu$ g/ml程度を必要とすることが知られている。しかしながら、これらの溶菌酵素の中で、イネの重要病害であるいもち病菌 (Pyricularia oryzae) に対して抗菌的に働くことが証明されたものは本発明者が知る範囲では未だ報告されていない。

一方、ディフェンシンをはじめとする小分子量AFP（抗真菌ペプチド；Anti-fungal peptide）も抗微生物活性を有する。このうちイネのいもち病菌（Pyricularia oryzae）と紋枯病菌（Rhizoctonia solani）の両方に対して抗菌的に働くものとしては、Ca-AMP1（特表平8-505048）及びCB-1（Oita他（1996）, Biosci. Biotech. Biochem. 60, p. 481-483）が、いもち病菌（Pyricularia oryzae）に対して抗菌活性があるものとして、Rs-AFP1とRs-AFP2（Terras他（1994）, J. Biol. Chem. 267, p. 15301-15309）、及びAce-AMP1（特表平9-501424）が報告されている。これらの低分子ペプチドは数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度で上記病原菌を含む各種の植物病原菌の生育を50%阻害する。

溶菌酵素あるいは低分子量抗菌ペプチドの遺伝子を単離して、植物に導入し、病害抵抗性植物を作出しようという試みもなされている（Broglie他（1991）, Science 254, p. 1194-1197；Zhu他（1994）, Bio/Technology 12, p. 807-812；Lin他（1995）, Bio/Technology 13, p. 686-691；Terras他（1995）, The Plant Cell 7, p. 573-588）。しかし、現状では、必ずしも実用化レベルの抵抗性を付与された植物体を得られていないことが多い。この理由としては、導入した遺伝子の発現レベルが低いことがあげられるが、より本質的には、これまでに報告されている抗菌タンパク質自体の抗菌力が低いことによるものと考えられる。従って、従来の抗菌タンパク質よりさらに強力な抗菌タンパク質を同定して利用を図ることが望まれている。

## 発明の概要

本発明の目的の1つは、比較的低濃度でイネの2大病害であるいもち病菌と紋枯病菌をはじめとする様々な植物病原菌の生長を抑止できる新規な抗菌タンパク質を検索、同定することである。

本発明の別の目的は、上記の新規タンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、その塩基配列を特定することである。

本発明のさらに別の目的は、本発明の遺伝子を宿主生物（微生物、動物または植物など）に導入して形質転換体を作成し、本発明の遺伝子の利用を図ることである。

本発明のさらに別の目的は、本発明の抗菌タンパク質を含む抗菌剤を提供することである。

### 図面の簡単な説明

図1は、Mono Qカラムによるホンシメジタンパク質の分離のチャートと抗菌性との関係を示す。

図2は、Mono Qカラムによるホンシメジ抗菌タンパク質の分離の電気泳動像と抗菌性との関係を示す。レーン上の番号は図1の画分番号に一致し、Mは分子量マーカーを示す。またレーン下の記号（－、＋、＋＋、＋＋＋）は抗菌活性の強さを示す。抗菌タンパク（70 kDaと65 kDa）を矢印で示した。

### 発明の詳細な説明

上記課題を解決することを目的として、本発明者らは、先ず、いもち病菌および紋枯病菌に対する *in vitro* での抗菌活性を検定するためのアッセイ系を確立した。次いで、本発明者らは、食用キノコ的一种であるホンシメジからタンパク質を抽出し、イオン交換カラムクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を組み合わせ、各画分を上記アッセイ系に供試することにより、抗菌タンパク質画分を同定し、抗菌タンパク質を単離・精製することに成功した。さらに本発明者らは、精製タンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、このアミノ酸配列に基づき合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用するRT-PCR法により当該タンパク質をコードする部分長cDNAを得た。次いで、本発明者らは、この部分長cDNAをプローブとして用いてホンシメジ由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、当該タンパク質をコードする完全長のcDNAを単離し、全塩基配列を決定した。上記の通り、本

発明者らは、ホンシメジ由来の新規な抗菌タンパク質の単離とそれをコードする DNA のクローニングに成功し、また当該タンパク質のアミノ酸配列と当該 DNA の塩基配列を決定して本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の第 1 の側面によれば、ホンシメジの水性抽出液から硫酸沈殿法  
5 で沈殿する画分から得ることができ、少なくともイネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を有し、SDS-PAGE 法で分子量が前駆体型で約 70 kDa、そして成熟型で約 65 kDa である、抗菌タンパク質が提供される。

本発明の抗菌タンパク質は、典型的には、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する。限定されるわけではないが、約 65 kDa の成熟型は、配列番号 1 のアミノ酸残基 76-618 からなると推測される。  
10

本発明の抗菌タンパク質は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のみでなく、当該配列において 1 から複数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列若しくはこの配列と 50 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、イネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を示す抗菌タンパク質も含む。

15 本発明の抗菌タンパク質は、好ましくは、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と 60 % 以上、より好ましくは 70 % 以上、さらに好ましくは 80 % 以上、特に好ましくは 90 % 以上、最も好ましくは 95 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する。

本発明の第 2 の側面によれば、配列表の配列番号 2 の部分アミノ酸配列、例えばアミノ酸残基 76-618、からなるポリペプチド；並びに上記アミノ酸配列の何れかの中に 1 ~ 複数個のアミノ酸変異を有するポリペプチドおよび上記アミノ酸配列の何れかと 50 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、イネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を示す当該ポリペプチド；の単独又は何れかのポリペプチドの組み合わせから成る抗菌タンパク質が提供される。  
20  
25

本発明の第 2 の側面による上記抗菌タンパク質に関して、各々の具体的アミノ酸配列と「50 % 以上の相同性を有するタンパク質」という定義は、少なくとも 50 % 以上の相同性を有していればよいことを意味するが、好ましくは 60 % 以上、より好ましくは 70 % 以上、さらに好ましくは 80 % 以上、特に好ましくは

90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質が意図される。

本発明の第3の側面によれば、ホンシメジの水性抽出液から硫酸75%飽和を使用する硫酸沈殿法で沈殿する画分を回収する工程；および

- 5 上記画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけNaCl濃度0.05Mから1Mの濃度で溶出する画分を回収する工程；

を含む、本発明の抗菌タンパク質の製造方法が提供される。

本発明の第4の側面によれば、本発明の抗菌タンパク質をコードする遺伝子が提供される。

- 10 本発明の遺伝子は、典型的には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列、上記塩基配列中に1～複数個の塩基の置換、欠失、挿入及び／又は付加を有する塩基配列、または上記塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する。

- 15 本発明の遺伝子は、一般的には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列と50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列を有する。

本発明の第5の側面によれば、ホンシメジ由来の抗菌タンパク質を得るためのオリゴヌクレオチドであって、

- 20 配列表の配列番号1に示す抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から以下の条件を満たすように2つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが15－30塩基であること；
- 2) 各領域中のG+Cの割合が40－60%であること；

- 25 上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを製造し、または、上記一本鎖DNAによってコードされるアミノ酸残基を変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖DNAの混合物を製造し、さらに必要であれば上記抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造することを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチドが提供される。

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列表の配列番号 7 ないし 12 の何れか 1 項に記載のヌクレオチド配列を有する。

本発明の第 6 の側面によれば、上記オリゴヌクレオチドの 2 種の組をプライマーとして用いて、ホンシメジ cDNA ライブラリーを鋳型にして増幅反応を行い  
5 本発明の抗菌タンパク質をコードする遺伝子の一部を増幅し、得られた増幅産物をプローブとして使用して上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングして完全長 cDNA クローンを単離することを含む、本発明の遺伝子の単離方法が提供される。

本発明の第 7 の側面によれば、本発明の遺伝子を含む組換えベクターが提供さ  
10 れる。

本発明の組換えベクターにおいて、好ましくは、ベクターは発現ベクターである。

本発明の第 8 の側面によれば、宿主生物に本発明の組換えベクターを導入して得られる形質転換体が提供される。

15 本発明の第 9 の側面によれば、本発明の抗菌タンパク質を有効成分として含む抗菌剤が提供される。

以下、本発明の説明のために、好ましい実施形態に関して詳述する。

本発明の第一の側面によれば、植物病原菌に対して抗菌効果のあるホンシメジ由来のタンパク質が提供される。本発明のタンパク質は本明細書に記載した特徴  
20 を有する限り、その起源、製法などは限定されない。即ち、本発明の抗菌タンパク質は、天然産のタンパク質、遺伝子工学的手法により組換え DNA から発現させたタンパク質、あるいは化学合成タンパク質の何れでもよい。

本発明のタンパク質は典型的には、配列表の配列番号 2 に記載の 618 個のアミノ酸配列を有する。しかし、天然のタンパク質の中にはそれを生産する生物種  
25 の品種の違いや、生態型 (ecotype) の違いによる遺伝子の変異、あるいはよく似たアイソザイムの存在などに起因して 1 から複数個のアミノ酸変異を有する変異タンパク質が存在することは周知である。なお、本明細書で使用する用語「アミノ酸変異」とは、1 以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加などを意味する。本発明のタンパク質は、クローニングされた遺伝子の塩基配列

からの推測に基づいて、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するが、その配列を有するタンパク質のみに限定されるわけではなく、本明細書中に記載した特性を有する限り全ての相同タンパク質を含むことが意図される。相同性は少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上である。

本明細書において、相同性のパーセントは、例えばAltschulら (Nucleic Acids Res. 25, p. 3389-3402, 1997) に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる相同性検索の各種条件（パラメーター）は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。

一般的に、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、ある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換）を導入した場合、得られる変異タンパク質は元のタンパク質と同様の性質を有することが多い。遺伝子組換え技術を使用して、このような所望の変異を有する組換えタンパク質を作製する手法は当業者に周知であり、このような変異タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

本発明のタンパク質は、SDS-PAGEで分子量が前駆体型（配列表の配列番号2の配列のうち第1番目から第618番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドに相当）が約70 kDa、そして成熟型（配列表の配列番号2の配列のうち第76番目から第618番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドに相当）が約65 kDaである。限定されるわけではないが、本発明の抗菌タンパク質は、典



型的には、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する。

従って、本発明によれば、配列表の配列番号 2 の第 1 番目から第 6 1 8 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチド；および第 7 6 番目から第 6 1 8 番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単独又は何れかの組み合わせから成る抗菌タンパク質が提供される。なお、上記ポリペプチドには、本明細書中上記したような変異を有する相同なポリペプチドも含まれる。

本発明のタンパク質は、例えば後述の実施例に従ってホンシメジ子実体から硫酸沈殿法およびイオン交換カラムクロマトグラフィー等を用いて精製することができる。あるいは、本発明による配列表の配列番号 1 の DNA 配列のうち、第 8 番目から第 1 8 6 1 番目の配列から成る DNA 配列、または第 2 3 3 番目から第 1 8 6 1 番目の配列から成る DNA 配列を、大腸菌や酵母あるいは昆虫やある種の動物細胞に、それぞれの宿主で増幅可能な発現ベクターを用いて導入、発現させることにより、当該タンパク質を大量に得ることができる。

本発明のホンシメジ由来抗菌タンパク質について、DDBJ の BLAST による相同性検索を行うと、最も相同性の高いものでアミノ酸配列全体同士で 4 5 % の相同性しか有しておらず、これ以外で相同性のある配列は存在していないことから、本タンパク質は新規なタンパク質であると考えられる。本発明によってこのタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする DNA 配列が開示されれば、当該配列またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーション、PCR 等の核酸増幅反応などの遺伝子工学的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することができる。このような場合、それらの遺伝子がコードする新規タンパク質も本発明の範囲に含まれる。上述の BLAST プログラムを用いて本発明の DNA 配列の相同性検索を行うと、非常に短い範囲（3 2 塩基）で相同性（9 3 %）を有するものがヒットするのみである。

本発明のホンシメジ由来の抗菌タンパク質が最も高い相同性（アミノ酸配列全体同士で 4 5 %）を有していたのは、カワラタケ（*Coriolus versicolor*）のピラノースオキシダーゼであった。ピラノースオキシダーゼは、グルコースを始めとするピラノース類を酸化し、2-ケト産物を過酸化水素を

生成させる酵素で、他のピラノースの測定への応用価値が述べられている。本明細書に援用される特開平 8 - 2 0 5 8 6 1 参照。本発明のホンシメジ由来抗菌タンパク質は、実際にピラノースオキシダーゼ活性を示し、その比活性は非常に高く、グルコースなどに対する  $K_m$  値も低いことが判明した。またイオン交換カラムによる画分の抗菌活性の強さとピラノースオキシダーゼ活性の高さはよく一致した。よって、本発明において見出されたホンシメジ由来の抗菌タンパク質の抗菌活性は、ピラノースオキシダーゼに関連すると推定される。理論に縛られるわけではないが、本発明における抗菌活性の作用機序としては、アッセイ培地に含まれるグルコースが本酵素によって化される過程で生じる過酸化水素が病原菌に有害に働く可能性が考えられる。

本発明のタンパク質の精製および単離は、硫安沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q、Q Sepharose または DEAE など) などのタンパク質の精製および単離のために慣用される方法を適宜組み合わせて行うことができる。

例えば、下記の実施例において記載するように、細粉化したホンシメジを緩衝液で抽出した後、ろ過し、その上清に硫安 (硫酸アンモニウム) を好適な濃度、例えば 75 % 飽和になるまで添加して静置することにより本発明のタンパク質を含む沈殿が得られる。この沈殿をさらに透析した後、イオン交換クロマトグラフィーにかけ、塩濃度のグラジエント (例えば、塩化ナトリウムで 50 mM から 1 M) で溶出し、所望のタンパク質を含む画分を回収すればよい。

本発明はまた、本発明の抗菌タンパク質をコードする遺伝子をも提供する。遺伝子の種類は特に限定されず、天然由来の DNA、組換え DNA、化学合成 DNA の何れでもよく、またゲノム DNA クローン、cDNA クローンの何れでもよい。

本発明の遺伝子は典型的には、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有するが、これは本発明の一例を示すにすぎない下記の実施例で得られたクローンの塩基配列である。天然の遺伝子の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態型 (ecotype) の違いに起因する少数の変異やよく似たアイソザイムの存在に起因する少数の変異が存在することは当業者に周知である。従って、本発

明の遺伝子は、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する遺伝子のみに限定されるわけではなく、本発明の抗菌タンパク質をコードする全ての遺伝子を包含する。

特に、本発明によってこのタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする DNA 配列が開示されれば、この配列またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することができる。このような場合、そのような遺伝子も本発明の範囲に含まれる。

相同遺伝子のスクリーニングのために使用するハイブリダイゼーション条件は特に限定されないが、一般的にはストリンジेंटな条件が好ましく、例えば、 $6\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhardt's}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 $25^\circ\text{C}$ ないし $68^\circ\text{C}$ などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。この場合、ハイブリダイゼーションの温度としては、より好ましくは $45^\circ\text{C}$ ないし $68^\circ\text{C}$ （ホルムアミド無し）または $25^\circ\text{C}$ ないし $50^\circ\text{C}$ （ $50\%$ ホルムアミド）を挙げることができる。ホルムアミド濃度、塩濃度及び温度などのハイブリダイゼーション条件を適宜設定することによりある一定の相同性以上の相同性を有する塩基配列を含む DNA をクローニングできることは当業者に周知であり、このようにしてクローニングされた相同遺伝子は全て本発明の範囲の中に含まれる。

核酸増幅反応は、例えば、複製連鎖反応（PCR）（サイキら、1985, *Science* 230, p. 1350-1354）、ライゲース連鎖反応（LCR）（ウーら、1989, *Genomics* 4, p. 560-569；バリンガーら、1990, *Gene* 89, p. 117-122；バラニーら、1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, p. 189-193）および転写に基づく増幅（コーら、1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, p. 1173-1177）等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応（SDA）（ウォーカーら、1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, p. 392-396；ウォーカーら、1992, *Nuc. Acids. Res.* 20, p. 1691-1696）、自己保持配列複製（3SR）（グアテリら、1990, *Proc. Natl. A*

cad. Sci. USA 87, p. 1874-1878) およびQ $\beta$ レプリカ  
ーゼシステム (リザイルディら、1988, BioTechnology 6,  
p. 1197-1202) 等の恒温反応を含む。また、欧州特許第052588  
2号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増  
幅 (Nucleic Acid Sequence Based Amplif  
ication: NASABA) 反応等も利用可能である。好ましくはPCR法  
である。

上記のようなハイブリダイゼーション、核酸増幅反応等を使用してクローニン  
グされる相同遺伝子は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列に対して少なくと  
も50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ま  
しくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相  
同性を有する。

本発明によればまた、ホンシメジ由来の抗菌タンパク質を得るためのオリゴヌ  
クレオチドであって、

配列表の配列番号1に示す抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から  
以下の条件を満たすように2つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが15-30塩基であること；
- 2) 各領域中のG+Cの割合が40-60%であること；

上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖D  
NAを製造し、または、上記一本鎖DNAによってコードされるアミノ酸残基を  
変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖DNAの混合物を製造し  
、さらに必要であれば上記抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対す  
る結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造する

ことを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチドが提供される。本発明  
のオリゴヌクレオチドは、例えば本発明の遺伝子を検出もしくは単離するための  
ハイブリダイゼーション、あるいは適当な2種をプライマー対として用いたPCR  
等の増幅反応に用いることが可能である。

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列表の配列番号8~12の何れ  
かに記載のヌクレオチド配列を有する。このヌクレオチド配列は、配列番号1の

アミノ酸配列に基づいて、各々のタンパク質をコードする遺伝子断片のクローニングのためのPCR用プライマーとして設計されたものであり、当該アミノ酸をコードすることが可能な全ての塩基をミックスしたプライマーである。

本発明の遺伝子の部分断片は、上記オリゴヌクレオチドの適切な組み合わせを使用してホンシメジ子実体cDNAライブラリーを鋳型にしてPCR等の核酸増幅反応を行うことにより増幅させて単離することができる。かくして得られた増幅産物をプローブとして使用してさらにcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーションなどでスクリーニングすることにより完全長のcDNAクローンを単離することができる。核酸増幅反応の手順及び条件、ブランクハイブリダイゼーションの条件などは当業者に周知である。

本発明によればまた、本発明の遺伝子を含む組換えベクターが提供される。プラスミドなどのベクターに本発明の遺伝子のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 53 (1989) に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、E-coil T B1, LE392 またはXL-1Blue等）に導入される。

プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 74 (1989) に記載のリン酸カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。

ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、プラスミドDNAなど）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラス

ミドとして、例えば、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322などが例示されるがこれらに限定されない。

5 所望のタンパク質を生産する目的においては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターの種類は、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞  
10 中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420などが好ましく、酵母用発現ベクターとしてpYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3-5K、pPIC9K、pAO815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとしてpBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5などが好ましい。

15 形質転換体は、所望の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。用いられる宿主細胞としては、本発明の発現ベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に制限はなく、本発明の技術分野において通常  
20 使用される天然の細胞、または人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞を用いることが可能である。例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などが挙げられる。

25 宿主細胞は、大腸菌、酵母または昆虫細胞が好ましく、具体的には、大腸菌（M15、JM109、BL21等）、酵母（INVScl（サッカロマイセス属）、GS115、KM71（以上ピキア属）など）、昆虫細胞（BmN4、カイコ幼虫など）などが例示される。また、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。さらに、植物  
30 細胞に関しては、細胞培養が可能であれば特に限定されないが、例えば、タバコ、アラビドプシス、イネ、トウモロコシ、コムギ由来の細胞などが例示される。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望の抗菌タンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成さ

れる。

宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望の抗菌タンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでいてもよい。

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAAなど）が例示される。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたプラスミド）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coliではプラスミドpQE30、pETまたはpCALもしくはそれらの人工的修飾物（pQE30、pETまたはpCALを適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母ではプラスミドpYES2もしくはpPIC9Kが、また昆虫細胞ではプラスミドpBacPAK8/9等があげられる。

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望の抗菌タンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライ

ゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

本発明の発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

- 5     例えば、細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis*等）の場合は、例えばCohenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110（1972）〕、プロトプラスト法〔*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111（1979）〕やコンピテント法〔*J. Mol. Biol.*, 56, 209（1971）〕によって、*Saccharomyce*  
10 *s cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927（1978）〕やリチウム法〔*J. Bacteriol.*, 153, 163（1983）〕によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法〔*Science*, 227, 129（1985）〕、エレクトロポレーション法〔*Nature*, 319, 791（1986）〕によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法〔*Virology*, 52, 456（1973）〕、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法〔*Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156-2165（1983）〕によってそれぞれ形質転換することができる。

- 本願発明のDNA断片を用いて病害抵抗性植物を作出する目的においては、植  
20 物形質転換用ベクターが有用である。植物用ベクターとしては、植物細胞中で当該遺伝子を発現し、当該タンパク質を生産する能力を有するものであれば特に限定されないが、例えば、pBI221、pBI121（以上Clontech社製）、及びこれらから派生したベクターが挙げられる。また、特に単子葉植物の形質転換には、pIG121Hm、pTOK233（以上Hieiら、*Plant J.*, 6, 271-282（1994））、pSB424（Komariら、*Plant J.*, 10, 165-174（1996））などが例示される。

形質転換植物は、上述のベクターの $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子の部位に本願発明のDNA断片を入れ替えて植物形質転換用ベクターを構築し、こ



れを植物に導入することで調整することができる。植物形質転換用ベクターは、少なくともプロモーター、翻訳開始コドン、所望の遺伝子（本願発明のDNA配列またはその一部）、翻訳終始コドンおよびターミネーターを含んでいることが好ましい。また、シグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、選抜マーカー領域などを適宜含んでいてもよい。

プロモーター、ターミネーターは植物細胞で機能するものであれば特に限定されないが、構成的発現をするプロモーターとしては、上記ベクターに予め組み込まれている35Sプロモーターの他に、アクチン、ユビキチン遺伝子のプロモーターなどが例示される。しかしながら、より好適には誘導性のプロモーターを組み入れて用いてもよい。こうすることで病虫害が形質転換植物に接触した時のみ、当該タンパクが生産され、抵抗性となる。用いられるべき誘導性プロモーターとしてはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、キチナーゼ、グルカナーゼ、チオニン、オズモチンあるいは病虫害やストレスに反応するその他の遺伝子のプロモーターが考えられる。

植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを用いる方法（Horsch et al., Science, 227, 129 (1985)、Hiei et al., Plant J., 6, 271-282 (1994)）、エレクトロポレーション法（Fromm et al., Nature, 319, 791 (1986)）、PEG法（Paszkowski et al., EMBO J., 3, 2717 (1984)）、マイクロインジェクション法（Crossway et al., Mol. Gen. Genet., 202, 179 (1986)）、微小物衝突法（McCabe et al., Bio/Technology, 6, 923 (1988)）などが挙げられるが、所望の植物に遺伝子を導入する方法であれば特に限定されない。また、宿主となる植物種も本発明の植物形質転換用ベクターに適合し、形質転換されるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される植物、例えば双子葉植物ではタバコ、アラビドプシス、トマト、キュウリ、ニンジン、ダイズ、バレイショ、テンサイ、カブ、ハクサイ、ナタネ、ワタ、ペチュニ

アなどが挙げられ、単子葉植物では、イネ、トウモロコシ、コムギなどが挙げられる。

本発明のタンパク質は極めて強力な抗菌活性をもつ。例えばイネのいもち病菌に対しては5 ng/mlという非常に低い濃度で胞子の発芽を完全に抑制する（  
5 後述の実施例2を参照）。この濃度においては長時間のインキュベーションの後にも胞子の発芽はみられないことから、本発明のタンパク質のいもち病菌に対する効果は、生長の部分的阻害というよりはむしろ、殺菌効果であると考えられる。このような低い濃度（ナノグラムオーダー）で、病原菌の生育を完全に抑止できる抗菌タンパク質は本発明者の知る範囲では現在までに報告されていない。後  
10 述の実施例においては、抗菌タンパク質の精製のための抗菌アッセイのための植物病原菌としてイネの最重要病害であるいもち病菌と紋枯病菌を使用した。同定したホンシメジ抗菌タンパク質が、これら以外の植物病害にも大差ないレベルで抗菌効果を有している可能性は極めて高い。このように本発明のホンシメジ由来の抗菌タンパク質は強い抗菌活性を有していることから、本発明のタンパク質  
15 は、抗菌剤や農薬などの薬剤としてそれが活性のある形で含まれるような製剤として利用することができる。この場合、本発明のタンパク質をコードするDNA配列を用いれば、先述のように例えば大腸菌や酵母などで機能する発現ベクターにそのDNAを組み込んで大量に製造することができる。

本発明のタンパクは、上記の如く調製された発現ベクターを含む形質転換細胞  
20 を栄養培地で培養することによって発現（生産）することができる。栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖、メタノールなどが、例示される。無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、  
25 コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また、所望により他の栄養素（例えば無機塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでもよい。培養は、当業界において

知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpH及び培養時間は、本発明のタンパクが大量に生産されるように適宜選択される。例えば、本発明の実施例4では大腸菌(M15)を宿主細胞として本発明の組換え抗菌タンパク質の発現を行った。限定されるわけではないが、大腸菌での発現の場合、

5 組換えタンパク質発現のための培養条件として、好ましくは4℃ないし40℃の温度で培養し、0.01mMないし5.0mMのIPTGによる誘導を行う。

本発明のタンパクは、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得することができる。すなわち、本発明のタンパクが宿主細胞内に蓄積する場合

10 には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞を集め、これを適当な緩衝液（例えば濃度が10M～100mM程度のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液などの緩衝液。pHは用いる緩衝液によって異なるが、pH5.0～9.0の範囲が望ましい）に懸濁した後、用いる宿主細胞に適した方法で細胞を破壊し、遠心分離により宿主細胞の内容物を得る。一方、本発明のタンパクが宿主細胞外に分泌される場合には、遠心分離やろ過などの操作により

15 宿主細胞と培地を分離し、培養ろ液を得る。宿主細胞破壊液、あるいは培養ろ液はそのまま、または硫酸沈殿と透析を行なった後に、本発明のタンパク質の精製、単離に供することができる。

精製・単離の方法としては、以下の方法が挙げることができる。即ち、当該タンパクに6×ヒスチジンやGST、マルトース結合タンパクといったタグを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれのタグに適したアフィニティークロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。例えば、限定するわけではないが、本明細書で後述する実施例4では、N-末端に6×ヒスチジンのタグを有する組換え抗菌タンパク質を発現させた。当該組換えタンパク質は、6×ヒスチジンに親和性を有するNi-NTAアガロース(Qiagen社)を使用して精製した。一方、そのようなタグを付けずに本発明のタンパクを生産した場合には、

20 例えば後述する実施例に詳しく述べられている方法、即ちイオン交換クロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。また、これに加えてゲルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィーなどを組み合わせる方法も挙げることができる。

上記の通り本発明の抗菌タンパク質は、真菌類あるいは細菌が関与する植物の疾患の予防及び治療などに利用することが可能である。即ち、本発明によれば、本発明の抗菌タンパク質を有効成分として含む抗菌剤が提供される。本発明の抗菌剤は通常、植物の全身または局所的に、散布することができる。

- 5 散布量は、植物の種類、生育段階、症状、散布方法、処理時間、散布するタンパク質の種類（全長のタンパク質、該タンパク質の一部を置換、欠失、挿入及び／又は付加したタンパク質など）、生育している場所の気候、生育している場所の土壌などにより異なるが、一日一回から複数回散布することができる。散布量は種々の条件により変動する。本発明の抗菌剤の散布に際しては、必要に応じて、溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などを混合して散布することも可能である。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤として混合される。水性の希釈剤としては、例えば蒸留水、食塩水などが挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類などが挙げられる。
- 10
- 15

このような抗菌組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤または安定化剤（例えばアルギニン、アスパラギン酸など）などの補助剤を含んでいてもよい。

- これらは、必要に応じてバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた、例えば凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物の形態で製造し、使用前に無菌の蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することもできる。
- 20

- このようにして得られる抗菌剤の剤形としては、使用する用途に応じて決めればよく、上記のような添加物と混合し、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、液剤、乳剤等の形態により散布することができる。
- 25

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

## 実施例1 アッセイ系の構築

### 1) 検定系の確立

病原菌の培養：イネいもち病菌（菌株TUS-1、レース337；農林水産省東北農業試験場より分譲）はオートミル培地（Difco社製、1%ショ糖添加）上で培養して分生胞子を得た。胞子液は10%グリセロールを加えて、-80℃で保存した。

イネ紋枯病菌（菌株JT872）は1/2ジャガイモ煎汁培地（PD培地：Difco社製）で2日間培養し、5×5mm程度の菌糸塊を3個をテフロンホモジナイザーで1/2PD培地とともに軽く磨砕して得られた断片化菌糸を接種源とした。

上記の接種源を96穴マイクロタイタープレート（コーニング社製）に1ウェル当たりいもち病菌分生胞子は約1,000個、紋枯病菌は断片化菌糸は約300個になる様に100μlの1/2PD培地とともに加え、28℃の恒温器で培養した。菌の増殖はマイクロプレートリーダー（Bio-Rad社製Benchmark）で595nmの吸光度を測定した。

塩、緩衝液の影響：菌の増殖に対する塩や緩衝液の影響を、培地にNaClやリン酸緩衝液、Tris緩衝液、Hepes緩衝液、牛血清アルブミン、ジチオスレイトールなどを一定量加えて判定した。

### 2) ホンシメジからのタンパク質抽出

ホンシメジ（日本産。滋賀県森林センターより入手）10gをあらかじめハサミで細かく切断後、液体窒素を用いて凍結して乳鉢で細粉となるまで磨砕し、30mlの50mM Hepes緩衝液を加えて30分間抽出を行った。抽出液はミラクロスでろ過後、10,000×g、20分間の遠心を行った上清に硫酸を75%飽和になるように加えて、一晚4℃で静置した。再度、15,000×g、20分間の遠心で沈殿させて、沈殿物を3mlの10mM Hepes緩衝液、pH7.5に溶解し、透析チューブ（Spectra/Por1 MWCO 6-8000, Spectrum Medical Industries社製）またはベンゾイル化透析チューブ（SIGMA社製）を用いて10mM Hepes緩衝液、pH7.5に対して透析を行って、不溶物を遠心によって除

去してホンシメジタンパク質試料とした。ホンシメジタンパク質試料のタンパク質濃度は牛血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として Bradford 法で測定した。

## 実施例 2 抗菌タンパクの精製

### 5 1) ホンシメジ粗タンパク試料の抗菌活性

いもち病菌、紋枯病菌の培養系に培養開始直後にホンシメジの粗タンパク質抽出液試料を一定量加えて、2日間まで培養して、吸光度変化を経時的に測定して抗菌性の有無について判定した。タンパク試料は希釈系列を作成し、抗菌性に対する希釈限界点を検出した。その結果、いもち・紋枯の両病原菌に対する高い抗  
10 菌活性が見いだされた (表 1)。

表 1 ホンシメジタンパク粗抽出液の抗菌活性

キノコ	抽出時 pH	完全生長阻害濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
		いもち病菌	紋がれ病菌
15 ホンシメジ	7.5	30	30

いもち病菌に対する完全生長阻害濃度は、 $30\mu\text{g}$  全抽出タンパク/ $\text{ml}$  以下と概算され、このことから、ホンシメジの抽出物の中には高い抗菌活性をもつ物質が含まれていることが明らかとなった。このタンパク抽出液の菌に対する生長  
20 阻害の様式は、濃度の高い場合は発芽の完全抑制、低い場合は菌糸の生長阻害が観察された。菌糸の伸長阻害程度は、明らかに濃度依存的であった。また、いもち病菌の細胞は、その細胞質が細胞壁から離れ、原形質分離様の様相を呈した。

### 2) イオン交換カラムによる精製

次に抗菌タンパク質の精製を行った。ホンシメジ  $70\text{g}$  を液体窒素中で粉碎し  
25 、 $200\text{ml}$  の緩衝液 ( $50\text{mM}$  MES,  $50\text{mM}$  NaCl, pH 6.0) 中で30分間タンパクを抽出した。二重のミラクロスで濾過した後、 $15000\times g$  で20分間遠心し、不純物を沈殿させた。上清を濾紙でさらに濾過し、タンパク試料とした。タンパク試料約  $200\text{ml}$  を、イオン交換体 Q-Sepharose FF (Pharmacia 社製) を充填したカラム (内径  $1.1\text{cm}\times 2$

0 cm) にかけた。流速は2.5 ml/分とし、基本緩衝液は50 mM Mes pH 6.0, 50 mM NaCl、溶出緩衝液は50 mM Mes pH 6.0, 1 M NaClを用い、グラジエント (NaClで50 mMから1 M) は、試料を打った100分後から120分間かけた。この後さらに溶出緩衝液を40分間流した。画分の回収は、グラジエント開始から40分ごとに4回行った (100 ml/画分)。これら4種の画分 (I, II, III, IV) の希釈系列を作製して、イネいもち病菌に対する抗菌アッセイを行った。その結果、画分II~IVに抗菌活性が認められた。これらの画分によって病原菌細胞には原形質分離が生じた。最も活性の高かった画分II (0~333 mM NaClに相当) をセントリプレップ10 (Amicon社製、MWCO 10,000) で濃縮し、イオン交換カラムMono QHR 5/5 (Pharmacia社製) にかき、抗菌タンパクを部分精製した。流速は1 ml/分とし、基本緩衝液は50 mM Mes pH 6.0, 50 mM NaCl、溶出緩衝液は50 mM Mes pH 6.0, 1 M NaClを用い、グラジエント (NaClで50 mMから1 M) は、試料を打った20分後から40分間かけた。各画分 (1 ml) の一部をいもち病菌に対する抗菌アッセイと、SDS-PAGE電気泳動に供試した。まず、HPLCのチャートと抗菌性の強さとの関係を図1に示した。抗菌性はMono Qの各画分から5、1、0.2  $\mu$ lをとり、いもち病菌に対するアッセイを行い、+++ (0.2  $\mu$ lまで阻害)、++ (1  $\mu$ lまで阻害)、+ (5  $\mu$ lまで阻害)、- (5  $\mu$ lでも阻害しない) の4段階で表示した。その結果、A280と、いもち菌に対する抗菌活性によりタンパクをモニターすると、pH 6.0においてイオン強度 (NaCl濃度) が250 mM付近に抗菌タンパクの溶出ピークが現れた。その後、イオン強度が高くなるにつれ、単位溶出液あたりのタンパク質の抗菌性は徐々に減少することが明らかとなった。

次に各画分から10  $\mu$ lをとり、等量の2×SDS泳動用緩衝液 (Sambrook et al. 1989) を加え、95℃で5分間処理した後、Laemmli (1970) の方法に従い、SDS-PAGE電気泳動を行った。ゲルは15%のPAGE L (ATTO社製) を用い、銀染色IIキットワコー (和光純薬社製) によりタンパク質を検出した。タンパクのおよその分子量と量を見積も

るため、分子量マーカー (LMW: Pharmacia LKB社製、分子量の大きい順に94 kDa、67 kDa、43 kDa、30 kDa、20.1 kDa、14.4 kDa) を1本のバンドが20 ngとなるように泳動した。電気泳動像と抗菌性の強さの関係を図2に示した。各レーンの上に表示した数字は、図1の画分の番号と同じもので、抗菌性の強さも図1に準じて表示した。抗菌性とリンクすると考えられるタンパクのバンドを精査すると、約70 kDaと、約65 kDaの2つのバンドが候補として挙げられた (図2矢印)。これら2種のバンドの濃度と抗菌活性の度合いは正の相関関係にあるので、これらのバンドが抗菌タンパク質本体である可能性が強く示唆された。このうち、特に65 kDaタンパクは、Q-Sepharoseによる分画においても、Mono Qによる分画においても、タンパクのバンドの濃度と、抗菌活性の強さとが非常によくリンクしていた。分子量マーカー (67 kDaのアルブミン) から、デンストメーターにより抗菌タンパクの量を推定し、いもち病菌に対する完全生長阻害濃度を算出すると、およそ5 ng/mlとなった。

### 3) 抗菌性タンパク質のN末アミノ酸配列の解説

上記のmono Qの画分番号36~44をセントリカットV-20 (クラボウ社製) で濃縮し、SDS-PAGE電気泳動した。トリスを除去し、グリシンを含まない緩衝液系でPVDF膜 (ミリポア社製) へ転写し、クマシーブリリアントブルーR-250で軽く染色した後、脱色した。その後、抗菌性タンパク質であると考えられた70 kDaと、65 kDaのタンパクバンドを切り出した。N末端アミノ酸配列は、気相プロテインシーケンサー (HPG1005A Protein Sequencing System) を用いて、エドマン分解法により決定した。

その結果、65 kDaタンパクからは次のような30アミノ酸

N末端-NAEEGTAVPYVPGYHKKNEIEFQKIDRFV-C  
末端 (配列番号3)  
が決定された。

一方、70 kDaタンパクは解説が不可能であった。この原因として、N末端がブロックされていることが考えられた。そこで、リシルエンドペプチダーゼ、



V8プロテアーゼを用いて、70 kDaタンパク質を部分消化し、43 kDaリ  
シルエンドペプチダーゼ消化物、45 kDa V8プロテアーゼ消化物を得た。こ  
れらの部分消化タンパク質のアミノ酸配列を再解析した結果、前者から24残基  
N末端-EFDESIRHTLVLRSLQDAYKDRQR-C末端（配列番  
5 号4）

後者から29残基

N末端-AERLIGTSTKEFDESIRHTLVLRSLQDAY-C末  
端（配列番号5）

が決定された。両アミノ酸配列は大部分が重複していたので、部分分解による内  
10 部アミノ酸配列は、全体で34残基

N末端-AERLIGTSTKEFDESIRHTLVLRSLQDAYKDR  
QR-C末端（配列番号6）

が決定されたことになる。決定されたアミノ酸配列に関して、データベースサー  
チを行ったところ、65 kDaタンパクからの30アミノ酸、70 kDaタンパ  
15 クからの34アミノ酸は、ともにカワラタケのピラノースオキシダーゼと相同性  
を示した。そこで、Mono Qの各画分のピラノースオキシダーゼ活性を測定し  
た。測定法は、Nishimura et al (1996)の方法に準じた。

その結果、ピラノースオキシダーゼ活性の高さと、抗菌活性の強さはよく一致し  
た。従って、抗菌性は、培地中のグルコースが本酵素によって酸化される際に生  
20 じる過酸化水素に由来すると推定された。次に、65 kDaと70 kDaの両タ  
ンパク質のみを含む画分（図2 番号42～44）を濃縮し、ピラノースオキシ  
ダーゼの諸性質を解析した。その結果、ホンシメジ由来抗菌タンパク質のピラノ  
ースオキシダーゼ活性は非常に高く、グルコースや、1, 5-アンヒドログルシ  
トールに対するKm値も低いことが明らかとなった（表2）。

表2 ホンシメジ抗菌タンパク質のピラノースオキシダーゼ活性とその諸性質

酵素タンパク	Km (mM)		比活性 (U/mg) *
	グルコース	1,5-アンヒドログルシトール	
ホンシメジ	0.50	6.5	101.6

\* 1U = 1  $\mu$  mole  $H_2O_2$ /分 pH7.0中、37℃

酵素タンパク量 (65 kDa + 70 kDa) は、SDS-PAGE 銀染色により定量した。

### 実施例3 cDNAの単離

#### 10 1) 縮重プライマーの設計

1) で決定されたアミノ酸配列を基に、考えられる全ての塩基がミックスされたプライマーを合成した (Tmは52~56℃、括弧内の数字は縮重度を示す)。具体的には、65 kDaタンパク由来のアミノ酸配列 (30残基) から以下の3種のプライマーを合成した。

15 65R1 (5' - g a r g a r g g i a c i g c i g t i c c - 3' (4)) (配列番号7)

65R2 (5' - g a r t t y c a r a a r g a y a t h g a y m g - 3' (384)) (配列番号8)

20 65R3 (5' - t t y g t i a a y g t i a t h t g y g g i g c - 3' (24)) (配列番号9)

一方、70 kDaタンパクの部分分解物由来のアミノ酸配列 (34残基) から、以下の3種のプライマーを合成した。

70F1 (5' - t g i c k d a t i s w y t c r t c r a a y t c - 3' (384)) (配列番号10)

25 70F2 (5' - t g i c k r t c y t t r t a i g c r t c y t g - 3' (64)) (配列番号11)

70F3 (5' - g g i g c r a a d a t i c k y t g i c k r t c - 3' (96)) (配列番号12)

上記プライマー中、rはaまたはgを、yはcまたはtを、hはaまたはcま

たは t を、m は a または c を、k は g または t を、d は a または g または t を、s は g または c を、w は a または t を、i はイノシンをそれぞれ示す。

## 2) ホンシメジ子実体 cDNA ライブラリーの構築

ホンシメジ子実体から SDS フェノール法で全核酸を抽出し、塩化リチウム沈殿により全 RNA を回収した。これから mRNA purification kit (Pharmacia 社製) によりホンシメジ mRNA を調製した。子実体約 10 g から 20  $\mu$ g の mRNA が得られた。このうち 5  $\mu$ g を ZAP cDNA synthesis kit (Stratagene 社製) に供試し、cDNA を合成した。ゲル濾過カラムにより 1~5 kb の cDNA を分画し、Uni-ZAP XR ベクター (Stratagene 社製) にライゲーションし、Gigapack III (Stratagene 社製) によりパッケージングを行った。全ての手順はキット添付の説明書に従った。構築したホンシメジ cDNA ライブラリーのタイターは、およそ 300 万 pfu と算出された。

## 3) RT-PCR によるプローブの取得

1) で合成したプライマーを用いて 2) で合成した cDNA を鋳型に PCR を行い、ライブラリーをスクリーニングするためのプローブとなるホンシメジタンパクの部分長 cDNA の増幅を試みた。反応条件は以下のように行った。50  $\mu$ l の反応液中に、cDNA 100 ng, 10 $\times$ Ex taq buffer 5  $\mu$ l, dNTPs 4  $\mu$ l, primer 10 pmol/each kind of sequence, Ex taq (Takara 社製) + Taq START antibody (Clontech 社製) 1  $\mu$ l をそれぞれ含み、プログラムテンプコントロールシステム PC-700 (ASTEK 社) を用いて、94 $^{\circ}$ C 3 分を 1 回、94 $^{\circ}$ C 1 分、50 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分を 35 回、72 $^{\circ}$ C 6 分を 1 回行った。その結果、65R1-70F1、65R1-70F2、65R2-70F1、65R2-70F2、65R2-70F3、65R3-70F1 のプライマー組み合わせにおいて約 0.4~0.5 kb の産物が増幅された。これらのうち増幅効率のより高かった 65R2-70F1 の組み合わせによる約 0.4 kb の断片をゲル精製し、ベクター pCRII (Invitrogen 社製) にクローニングし、塩基配列を決定した。この塩基配列から推

定されるアミノ酸配列は、23)で決定されたアミノ酸配列の一部と同一の配列を含み、しかも配列全体に渡ってカワラタケのピラノースオキシダーゼと緩い相同性を示した。このことから、精製した70 kDaと65 kDaの抗菌タンパク質は、一つの遺伝子にコードされ、RT-PCRにより得られたcDNAクローンはホンシメジ抗菌タンパク質の部分長cDNAであることが確認された。

#### 4) 完全長cDNAのスクリーニング

3)で得られたクローンをベクターから切り出し、これをプローブに用いて2)で構築したホンシメジcDNAライブラリーをスクリーニングした。14×10 cmの角形シャーレにZAP cDNA synthesis kit (Stratagene社製)の説明書に従って、約15000 pfuのファージを宿主菌XL1-blue MRF'とともにプレーティングした。プラークをHybond-N+ナイロンメンブレンフィルター (Amersham社製)に接触させ、メンブレン添付の説明書に従ってアルカリ処理を行い、DNAを変性させ、メンブレン上に固定させた。ハイブリダイゼーション、および洗浄の条件は、メンブレンに添付の説明書に従って高いストリンジェンシーで行った。

1次スクリーニングで約120,000 pfuのファージから20個のポジティブクローンが得られた。これらのクローンに関して、2次スクリーニング、プラークの精製を兼ねた3次スクリーニングを行い、20個全てについてZAP cDNA synthesis kit (Stratagene社製)の説明書に従って、in vivo excisionを行った。その結果、18個のクローンが、ファージミドベクターpBluescript SKに組み込まれたcDNAとして回収された。これらのクローンの長さは1.7~2.1 kbであり、制限酵素分析から非常によく似た遺伝子由来であることが示唆された。

#### 5) 塩基配列の決定

上記の18個のcDNAクローンについて、5'および3'側の塩基配列およそ500 bpを決定した。得られた塩基配列データをGenetyx ver. 9.0解析ソフト (Software Development社製)を用いて解析した。その結果、ポリA付加部位にはクローン間で差異があるものの、全てのクローンが23)で決定した65 kDaタンパクの30アミノ酸をコードする

- DNA配列を含んでいた。番号13 (2.1 kb) のcDNAクローンが最長であつたので、このクローンの全塩基配列を決定した。プライマーウォーキング法により、ABI PRISM蛍光シーケンサー (Model 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer社製) を用いて塩基配列を決定した。その結果、ホンシメジ抗菌タンパクをコードするcDNAは全長2106塩基対からなり、1854塩基対のオープンリーディングフレームを含み、618個のアミノ酸をコードしていた (配列番号1および2)。アミノ酸配列から推定される分子量は約68487、等電点は6.12と算出された。精製タンパクから決定されたアミノ酸配列は、65 kDa由来30アミノ酸が、配列表
- 10 配列番号2のアミノ酸番号76~105に、70 kDa由来34アミノ酸が、同211~244にそれぞれ対応した。これは65 kDaと70 kDaタンパクが同じ一つの遺伝子にコードされていることを意味する。さらに推定糖鎖付加部位が7カ所 (配列表配列番号2のアミノ酸番号154、319、360、412、558、573、583) 存在していた。
- 15 以上の結果から、クローニングしたcDNAはホンシメジ抗菌タンパクをコードする遺伝子に由来すると結論された。本発明のホンシメジ由来抗菌タンパク質のアミノ酸配列について、データベース (DDBJ) 上で相同性検索 (BLAST) を実施したところ、カワラタケのピラノースオキシダーゼのアミノ酸配列と全体で45%の同一性を有していた。これ以外で有意に相同性のある配列は存在
- 20 していないことから、本遺伝子は新規なピラノースオキシダーゼ様タンパク質をコードする遺伝子であると考えられる。

#### 実施例4. 大腸菌内発現と組換えタンパク質の精製

##### 1) 発現ベクターの構築

- 実施例3の5) で単離した13番のcDNAクローンには、翻訳終止コドンの
- 25 約0.06 kb下流に唯一のEcoT22I制限部位が、また翻訳終止コドンの約0.25 kb上流に唯一のBamHI制限部位が存在する。またこのcDNAの5'側のベクター上のマルチクローニングサイトには、BamHIが存在する。そこで、まずこのcDNAが組みこまれたプラスミド (ベクターはpBlue script) を制限酵素EcoT22I (Takara社製) で完全消化し、

その後BamHI (Takara社製)で部分消化した。その結果生じた約2 kbのBamHI (ベクター上のBamHI) —EcoT22I断片を、予め制限酵素BamHI、PstIで二重消化した大腸菌用発現ベクターpQE30 (Qiagen社製)へ組みこんだ (pQEHSPOfullと命名)。完成した構築物は、本発明のホンシメジピラノースオキシダーゼ様タンパクをコードする完全長cDNAの最長オープンリーディングフレーム (ORF) を含み (配列表の配列番号1の第8番目から第1864番目の塩基配列を含む。これは配列表の配列番号2の全アミノ酸配列をコードする)、発現タンパク質のN末端にはタグとして6個のヒスチジン残基が付加される。

## 10 2) 大腸菌内発現

宿主大腸菌M15株を用いて発現実験を行った。菌の培養方法、IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside) によるタンパク発現誘導方法はQiagen社の説明書に従った。抗生物質アンピシリン、カナマイシンを含むLB培地中でOD<sub>600</sub>=0.5程度になるまで菌を前培養し、その後同じ培地中で各種温度、各種IPTG濃度にて一定時間培養し発現誘導を行った。菌体からQiagen社の説明書に従って可溶性タンパク質を抽出し、そのうちの一定量をNishimura et al. (1996)の方法に従ってピラノースオキシダーゼ活性を測定した。組換えタンパク質の発現結果を表3にまとめた。

20

表3. ホンシメジピラノースオキシダーゼの大腸菌発現

構築物	誘導条件	ピラノースオキシダーゼ活性		
		(mU/mL culture)		
	培養温度	I P T G濃度	培養時間 5時間	21時間
25 pQEHSPOfull	37°C	2mM	0	0
	25°C	0.5mM	2.5	1
	16°C	0.1mM	1.5	3.4
pQE30 (対照)	25°C	0.5mM	0	0
	16°C	0.1mM	0	0

まず最初に通常の誘導条件である培養温度 37°C、IPTG 濃度 2 mM で誘導を試みたが、不溶性封入体は大量に発現したものの、可溶性画分のピラノースオキシダーゼ活性が検出されなかった。そこで種々の条件で発現誘導を行い、可溶性画分のピラノースオキシダーゼ活性を測定した。その結果、誘導条件を緩くするにつれ、即ち培養温度や IPTG 濃度を下げていくにつれピラノースオキシダーゼ活性が上昇した。これは誘導条件の緩和により、可溶性組換えタンパク質含量が増加したためと考えられた。一方、対照とした pQE 30 (ベクターのみ) では活性は全く検出されなかった。以上の結果からクローニングした cDNA は確かに活性のあるピラノースオキシダーゼ様タンパク質をコードしていることが明らかとなった。なお、培養温度 25°C、IPTG 濃度 0.5 mM では 5 時間の培養に比べ、21 時間での培養は活性が下がった。これはおそらく発現タンパク質が分解されていることを示唆している。

次に発現タンパク質の精製を試みた。培養温度 16°C、IPTG 濃度 0.1 mM で発現誘導した菌体由来の可溶性タンパク質画分から、Ni-NTA アガロース (Qiagen 社製) を用いて組換えピラノースオキシダーゼ様タンパク質の精製を行った。Qiagen 社の説明書に従って、タンパク質の吸着、洗浄、溶出を行ったところ、溶出画分にのみピラノースオキシダーゼ活性が検出された。従って、組換えタンパク質の N 末端は大腸菌内で分解されておらず、ヒスチジン残基が N 末に結合していること、それを利用して組換えタンパク質を Ni-NTA アガロースによって容易に精製出来ること、またクローニングした完全長 cDNA の全コード領域は、そのままで (タンパクの N 末端側に相当する部分を除去しなくても) 活性のあるタンパク質をコードしていることが明らかとなった。組換えタンパク質の収量は大腸菌培養液 1 l 当たり数 mg と推定された。

## 効果

本発明の配列表の配列番号 2 の配列または、このうち第 1 番目から第 75 番目の配列を除いた全配列を含むことを特徴とするタンパク質成分を有効成分として含む製剤を作出すれば、強力な抗菌剤としての利用が期待できる。また、上記タンパク質成分を有効成分として含む試薬を作出すれば、血糖など、糖の測定に利

- 用することが出来る。本発明の配列表の配列番号1のDNA配列のうち、第8番目から第1864番目の配列であることを特徴とするDNA配列、または第23番目から第1864番目の配列であることを特徴とするDNA配列を、植物細胞の中で機能しうる適当な構成的、器官・時期特異的、あるいはストレスや病害虫で誘導されるプロモーター配列と、植物細胞で機能しうるターミネター配列の発現カセットに組み込み、植物細胞に導入、再生個体を得ることにより、病害虫抵抗性植物を作出できることが期待される。あるいはまた、上記のDNA配列を大腸菌や酵母あるいは昆虫やある種の動物細胞に、それぞれの宿主で増幅可能な発現ベクターを用いて導入、発現させることにより、当該タンパクを大量に安価に得ることができる。



請求の範囲

1. ホンシメジの水性抽出液から硫酸沈殿法で沈殿する画分から得ることができ、少なくともイネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を有し、  
5 SDS-PAGE法で分子量が約70 kDaおよび/または約65 kDaの成分の存在を示す、抗菌タンパク質。
2. N末端が、配列表の配列番号3に記載のN末端アミノ酸配列：Asn Ala Glu Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His Lys Lys Asn Glu Ile Glu Phe Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Valを有する、請求項1に記載の抗菌タン  
10 パク質。
3. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列、あるいはこの配列中に1から複数個のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列若しくはこの配列と50%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、イネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を示す抗菌タンパク質。
- 15 4. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。
5. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。
6. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有する  
20 アミノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。
7. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。
8. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する請求項3に記載の抗菌タンパク質。
- 25 9. 配列表の配列番号2の部分アミノ酸配列76-618からなるポリペプチド、並びに上記アミノ酸配列の何れかの中に1～複数個のアミノ酸変異を有するポリペプチドおよび上記アミノ酸配列の何れかと50%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであってイネ紋枯病菌またはイネいもち病菌に対する抗菌活性を示す当該ポリペプチド、の単独又は何れかのポリペプチドの

組み合わせから成る抗菌タンパク質。

10. ホンシメジの水性抽出液から硫酸75%飽和を使用する硫酸沈殿法で沈殿する画分を回収する工程；および

上記画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけNaCl濃度0.05Mから  
5 1Mの濃度で溶出する画分を回収する工程；

を含む、請求項1、3または9に記載の抗菌タンパク質の製造方法。

11. 請求項1、3または9に記載の抗菌タンパク質をコードする遺伝子。

12. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列、上記塩基配列中に1～複数個の塩基の置換、欠失、挿入及び／又は付加を有する塩基配列、または上記塩基配列  
10 とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

13. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と50%以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

14. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と60%以上の相同性を有する塩  
15 基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

15. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と70%以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

16. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

20 17. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

18. 配列表の配列番号1に記載の塩基配列と95%以上の相同性を有する塩基配列を有する請求項11に記載の遺伝子。

25 19. ホンシメジ由来の抗菌タンパク質をコードする遺伝子を得るためのオリゴヌクレオチドであって、

配列表の配列番号1に示す抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から以下の条件を満たすように2つの領域を選択し：

- 1) 各領域の長さが15－30塩基であること；
- 2) 各領域中のG＋Cの割合が40－60%であること；

上記領域と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAを製造し、または、上記一本鎖DNAによってコードされるアミノ酸残基を変化させないように遺伝子暗号の縮重を考慮した一本鎖DNAの混合物を製造し、さらに必要であれば上記抗菌タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖DNAを製造する

5 ことを含む方法により製造された当該オリゴヌクレオチド。

20. 配列表の配列番号7ないし12の何れかに記載のヌクレオチド配列を有する請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

21. 請求項19に記載のオリゴヌクレオチドの2種をプライマー対として用いて、ホンシメジ子実体cDNAライブラリーを鋳型にして核酸増幅反応を行い

10 請求項1に記載の抗菌タンパク質をコードする遺伝子の一部を増幅し、得られた増幅産物をプローブとして使用して上記cDNAライブラリーをスクリーニングして完全長cDNAクローンを単離することを含む、請求項11に記載の遺伝子の単離方法。

15 22. 請求項11に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

23. ベクターが発現ベクターである請求項22に記載の組換えベクター。

24. 宿主生物に請求項22に記載の組換えベクターを導入して得られる形質転換体。

25. 請求項24の形質転換体を抗菌タンパク質の発現を促進する条件下で培養することを含む、請求項1、3または9に記載の抗菌タンパク質の製造方法。

20

26. 請求項25に記載の方法によって得られた組換え抗菌タンパク質。

27. 請求項1に記載の抗菌タンパク質を有効成分として含む抗菌剤。

図 1

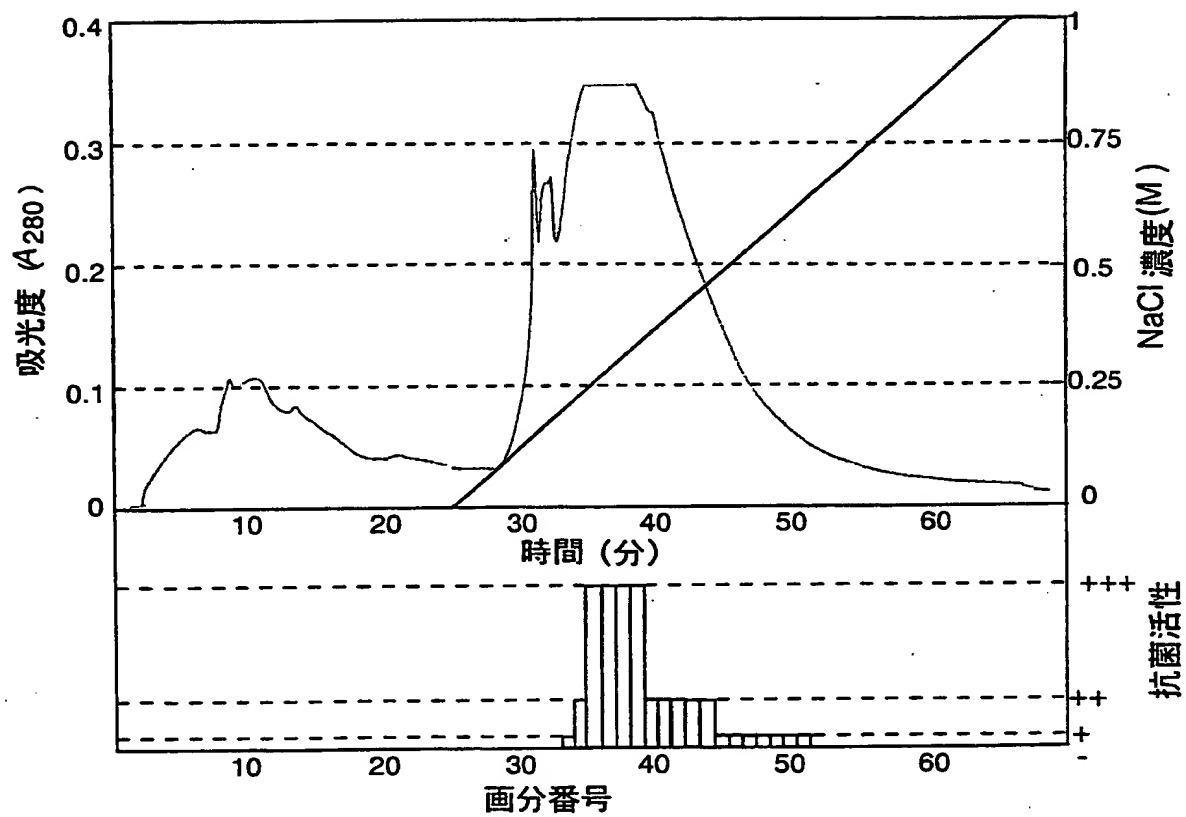
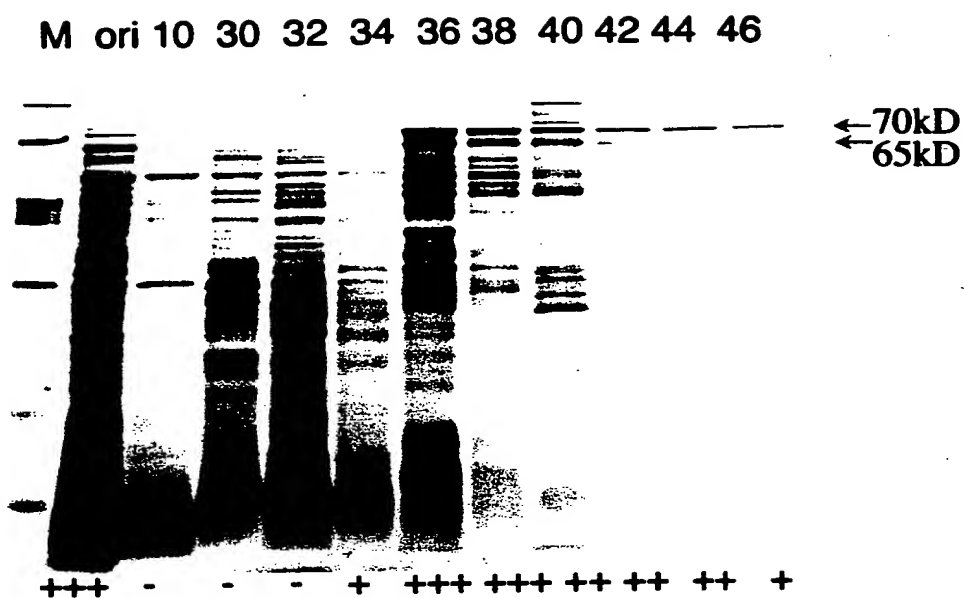


図 2



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC. and NORINSUISAN-SENTANGIJYUTU SANGYOUSHINKOU CE  
NTOR

<120> A novel protein, a gene coding therefor and a method of using the  
same

<130> YCT517

<160> 12

<210> 1

<211> 2106

<212> DNA

<213> Lyophyllum shimeji

<220>

<221> CDS

<222> (8)... (1861)

<400> 1

atcagcc atg tct ctc tca acc gag cag atg cta cgc gac tat cca cgg 49

Met Ser Leu Ser Thr Glu Gln Met Leu Arg Asp Tyr Pro Arg

1

5

10

tct atg caa atc aac gga cag att cct aag aac gca att cac gaa aca 97

Ser Met Gln Ile Asn Gly Gln Ile Pro Lys Asn Ala Ile His Glu Thr

15

20

25

30

tac gga aac gac gga gtt gat gta ttc att gca gga tct gga ccc att 145

Tyr Gly Asn Asp Gly Val Asp Val Phe Ile Ala Gly Ser Gly Pro Ile

35

40

45

gga gcg acg tat gca aag ctc tgt gtt gaa gct ggt cta cgt gtt gtg 193

Gly Ala Thr Tyr Ala Lys Leu Cys Val Glu Ala Gly Leu Arg Val Val  
                   50                                  55                                  60  
 atg gtc gag atc gga gct gct gat agc ttc tac gct gtt aat gcc gaa 241  
 Met Val Glu Ile Gly Ala Ala Asp Ser Phe Tyr Ala Val Asn Ala Glu  
                   65                                  70                                  75  
 gaa gga act gca gtt ccc tac gtt cct ggc tac cac aag aag aat gaa 289  
 Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His Lys Lys Asn Glu  
                   80                                  85                                  90  
 atc gag ttc cag aaa gat att gac cgc ttc gtc aat gta atc aag gga 337  
 Ile Glu Phe Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Val Asn Val Ile Lys Gly  
                   95                                  100                                  105                                  110  
 gcc tta caa caa gtc tct gtt cct gtc aga aac cag aac gtg cct aca 385  
 Ala Leu Gln Gln Val Ser Val Pro Val Arg Asn Gln Asn Val Pro Thr  
                   115                                  120                                  125  
 ctt gat ccc gga gcc tgg agc gcg ccc cct gga agt tca gcc ata tcg 433  
 Leu Asp Pro Gly Ala Trp Ser Ala Pro Pro Gly Ser Ser Ala Ile Ser  
                   130                                  135                                  140  
 aac ggt aaa aat cct cac cag cgg gaa ttc gag aac ttg tct gcg gag 481  
 Asn Gly Lys Asn Pro His Gln Arg Glu Phe Glu Asn Leu Ser Ala Glu  
                   145                                  150                                  155  
 gcc gta acg cgt gga gtc ggc ggc atg agt acc cac tgg acg tgc tcc 529  
 Ala Val Thr Arg Gly Val Gly Gly Met Ser Thr His Trp Thr Cys Ser  
                   160                                  165                                  170  
 acg cca cgg att cat cca ccc atg gaa agt ctc ccg ggc atc ggc cgt 577  
 Thr Pro Arg Ile His Pro Pro Met Glu Ser Leu Pro Gly Ile Gly Arg  
                   175                                  180                                  185                                  190  
 ccg aag ctc agt aac gac ccg gca gag gac gac aaa gag tgg aac gag 625  
 Pro Lys Leu Ser Asn Asp Pro Ala Glu Asp Asp Lys Glu Trp Asn Glu  
                   195                                  200                                  205

ctt tat tcc gag gcc gag cgt ctc atc ggg act tcc acc aag gaa ttc 673  
 Leu Tyr Ser Glu Ala Glu Arg Leu Ile Gly Thr Ser Thr Lys Glu Phe  
                   210                                  215                                  220  
 gac gag tca att cgg cac acc ctt gtt ctg cgc tct ttg caa gac gcg 721  
 Asp Glu Ser Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu Gln Asp Ala  
                   225                                  230                                  235  
 tac aag gat cgt caa cgt atc ttt cgc cct ctc ccg ttg gca tgc cac 769  
 Tyr Lys Asp Arg Gln Arg Ile Phe Arg Pro Leu Pro Leu Ala Cys His  
                   240                                  245                                  250  
 cgg ttg aag aac gcg ccg gaa tac gtc gaa tgg cac tca gca gaa aat 817  
 Arg Leu Lys Asn Ala Pro Glu Tyr Val Glu Trp His Ser Ala Glu Asn  
 255                                  260                                  265                                  270  
 ctt ttc cac tct atc tac aac gat gac aag cag aag aag ctc ttt acc 865  
 Leu Phe His Ser Ile Tyr Asn Asp Asp Lys Gln Lys Lys Leu Phe Thr  
                                   275                                  280                                  285  
 ctg ctg acg aac cat cgc tgc aca cga ctg gcg ctt acg ggc ggg tat 913  
 Leu Leu Thr Asn His Arg Cys Thr Arg Leu Ala Leu Thr Gly Gly Tyr  
                                   290                                  295                                  300  
 gag aag aag att ggc gct gcc gag gtc agg aat cta ctg gcc acc agg 961  
 Glu Lys Lys Ile Gly Ala Ala Glu Val Arg Asn Leu Leu Ala Thr Arg  
                   305                                  310                                  315  
 aat cct agt tcg cag ctg gac agc tat atc atg gcg aag gta tat gta 1009  
 Asn Pro Ser Ser Gln Leu Asp Ser Tyr Ile Met Ala Lys Val Tyr Val  
                   320                                  325                                  330  
 ctg gcg tcg gga gcg atc ggc aac cca cag att ctc tat aac tcg ggc 1057  
 Leu Ala Ser Gly Ala Ile Gly Asn Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Ser Gly  
 335                                  340                                  345                                  350  
 ttc tct ggg cta cag gtc acg cca cgc aat gac tcg ttg atc ccc aac 1105  
 Phe Ser Gly Leu Gln Val Thr Pro Arg Asn Asp Ser Leu Ile Pro Asn



355	360	365	
ctg ggg agg tac atc acg gag cag ccg atg gca ttt tgc cag ata gtc			1153
Leu Gly Arg Tyr Ile Thr Glu Gln Pro Met Ala Phe Cys Gln Ile Val			
370	375	380	
ttg agg cag gaa ttc gtc gac agc gtg cgc gac gat cct tat gga ctg			1201
Leu Arg Gln Glu Phe Val Asp Ser Val Arg Asp Asp Pro Tyr Gly Leu			
385	390	395	
cca tgg tgg aaa gaa gcc gtt gct caa cat att gcc aag aac ccg aca			1249
Pro Trp Trp Lys Glu Ala Val Ala Gln His Ile Ala Lys Asn Pro Thr			
400	405	410	
gat gca ctg ccc att ccg ttc cgc gat ccg gaa ccc cag gta aca acc			1297
Asp Ala Leu Pro Ile Pro Phe Arg Asp Pro Glu Pro Gln Val Thr Thr			
415	420	425	430
cca ttt aca gaa gaa cac ccc tgg cac acg cag att cac cgc gat gct			1345
Pro Phe Thr Glu Glu His Pro Trp His Thr Gln Ile His Arg Asp Ala			
435	440	445	
ttt tgc tac ggt gcc gtc ggt cct gag gtg gac tct cgt gtc atc gtc			1393
Phe Ser Tyr Gly Ala Val Gly Pro Glu Val Asp Ser Arg Val Ile Val			
450	455	460	
gac ctg cgc tgg ttt ggc gca acc gac cct gaa gca aac aac ctt ttg			1441
Asp Leu Arg Trp Phe Gly Ala Thr Asp Pro Glu Ala Asn Asn Leu Leu			
465	470	475	
gtt ttc cag aac gat gtt caa gac ggg tac agt atg ccg cag ccg acg			1489
Val Phe Gln Asn Asp Val Gln Asp Gly Tyr Ser Met Pro Gln Pro Thr			
480	485	490	
ttc aga tat cga ccc agc act gcg tca aac gtg aga gca agg aaa atg			1537
Phe Arg Tyr Arg Pro Ser Thr Ala Ser Asn Val Arg Ala Arg Lys Met			
495	500	505	510
atg gcc gat atg tgc gaa gtg gcg agc aac ttg gga ggt tat ttg ccc			1585

Met Ala Asp Met Cys Glu Val Ala Ser Asn Leu Gly Gly Tyr Leu Pro  
 515 520 525  
 acg tcc ccc ccg cag ttt atg gat cca ggc ctt gca ctt cat ctt gcg 1633  
 Thr Ser Pro Pro Gln Phe Met Asp Pro Gly Leu Ala Leu His Leu Ala  
 530 535 540  
 ggg act act cgc att ggc ttc gac aag gca act aca gtg gct gat aac 1681  
 Gly Thr Thr Arg Ile Gly Phe Asp Lys Ala Thr Thr Val Ala Asp Asn  
 545 550 555  
 aac tcg ctg gtc tgg gac ttt gcc aat ctt tat gtt gca ggc aat ggc 1729  
 Asn Ser Leu Val Trp Asp Phe Ala Asn Leu Tyr Val Ala Gly Asn Gly  
 560 565 570  
 acc atc agg acg ggc ttc ggc gag aac ccg aca ctt acg tcg atg tgc 1777  
 Thr Ile Arg Thr Gly Phe Gly Glu Asn Pro Thr Leu Thr Ser Met Cys  
 575 580 585 590  
 cac gct atc aag agc gcg agg agc atc atc aat aca ctc aag ggt ggg 1825  
 His Ala Ile Lys Ser Ala Arg Ser Ile Ile Asn Thr Leu Lys Gly Gly  
 595 600 605  
 act gac gga aaa aat aca ggc gag cat cgc aac ctt tga ggaaggagca ac 1876  
 Thr Asp Gly Lys Asn Thr Gly Glu His Arg Asn Leu  
 610 615 618  
 agcagtgtaa acaaacgcgt caagtggcta ctccaagttg aatgcattct ggtcccctac 1936  
 catgttgatg tgtacgatag gcgttgaaag attttgtgta ttactgaacc tgtactttgt 1996  
 ctgaatagtt atggcactat gattcatgtt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2056  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2106

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 618

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lyophyllum shimeji

&lt;400&gt; 2

Met Ser Leu Ser Thr Glu Gln Met Leu Arg Asp Tyr Pro Arg Ser		
1	5	10 15
Met Gln Ile Asn Gly Gln Ile Pro Lys Asn Ala Ile His Glu Thr		
	20	25 30
Tyr Gly Asn Asp Gly Val Asp Val Phe Ile Ala Gly Ser Gly Pro		
	35	40 45
Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Lys Leu Cys Val Glu Ala Gly Leu Arg		
	50	55 60
Val Val Met Val Glu Ile Gly Ala Ala Asp Ser Phe Tyr Ala Val		
	65	70 75
Asn Ala Glu Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His		
	80	85 90
Lys Lys Asn Glu Ile Glu Phe Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Val		
	95	100 105
Asn Val Ile Lys Gly Ala Leu Gln Gln Val Ser Val Pro Val Arg		
	110	115 120
Asn Gln Asn Val Pro Thr Leu Asp Pro Gly Ala Trp Ser Ala Pro		
	125	130 135
Pro Gly Ser Ser Ala Ile Ser Asn Gly Lys Asn Pro His Gln Arg		
	140	145 150
Glu Phe Glu Asn Leu Ser Ala Glu Ala Val Thr Arg Gly Val Gly		
	155	160 165
Gly Met Ser Thr His Trp Thr Cys Ser Thr Pro Arg Ile His Pro		
	170	175 180
Pro Met Glu Ser Leu Pro Gly Ile Gly Arg Pro Lys Leu Ser Asn		
	185	190 195
Asp Pro Ala Glu Asp Asp Lys Glu Trp Asn Glu Leu Tyr Ser Glu		

200	205	210
Ala Glu Arg Leu Ile Gly Thr Ser Thr Lys Glu Phe Asp Glu Ser		
215	220	225
Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu Gln Asp Ala Tyr Lys		
230	235	240
Asp Arg Gln Arg Ile Phe Arg Pro Leu Pro Leu Ala Cys His Arg		
245	250	255
Leu Lys Asn Ala Pro Glu Tyr Val Glu Trp His Ser Ala Glu Asn		
260	265	270
Leu Phe His Ser Ile Tyr Asn Asp Asp Lys Gln Lys Lys Leu Phe		
275	280	285
Thr Leu Leu Thr Asn His Arg Cys Thr Arg Leu Ala Leu Thr Gly		
290	295	300
Gly Tyr Glu Lys Lys Ile Gly Ala Ala Glu Val Arg Asn Leu Leu		
305	310	315
Ala Thr Arg Asn Pro Ser Ser Gln Leu Asp Ser Tyr Ile Met Ala		
320	325	330
Lys Val Tyr Val Leu Ala Ser Gly Ala Ile Gly Asn Pro Gln Ile		
335	340	345
Leu Tyr Asn Ser Gly Phe Ser Gly Leu Gln Val Thr Pro Arg Asn		
350	355	360
Asp Ser Leu Ile Pro Asn Leu Gly Arg Tyr Ile Thr Glu Gln Pro		
365	370	375
Met Ala Phe Cys Gln Ile Val Leu Arg Gln Glu Phe Val Asp Ser		
380	385	390
Val Arg Asp Asp Pro Tyr Gly Leu Pro Trp Trp Lys Glu Ala Val		
395	400	405
Ala Gln His Ile Ala Lys Asn Pro Thr Asp Ala Leu Pro Ile Pro		
410	415	420

Phe Arg Asp Pro Glu Pro Gln Val Thr Thr Pro Phe Thr Glu Glu		
425	430	435
His Pro Trp His Thr Gln Ile His Arg Asp Ala Phe Ser Tyr Gly		
440	445	450
Ala Val Gly Pro Glu Val Asp Ser Arg Val Ile Val Asp Leu Arg		
455	460	465
Trp Phe Gly Ala Thr Asp Pro Glu Ala Asn Asn Leu Leu Val Phe		
470	475	480
Gln Asn Asp Val Gln Asp Gly Tyr Ser Met Pro Gln Pro Thr Phe		
485	490	495
Arg Tyr Arg Pro Ser Thr Ala Ser Asn Val Arg Ala Arg Lys Met		
500	505	510
Met Ala Asp Met Cys Glu Val Ala Ser Asn Leu Gly Gly Tyr Leu		
515	520	525
Pro Thr Ser Pro Pro Gln Phe Met Asp Pro Gly Leu Ala Leu His		
530	535	540
Leu Ala Gly Thr Thr Arg Ile Gly Phe Asp Lys Ala Thr Thr Val		
545	550	555
Ala Asp Asn Asn Ser Leu Val Trp Asp Phe Ala Asn Leu Tyr Val		
560	565	570
Ala Gly Asn Gly Thr Ile Arg Thr Gly Phe Gly Glu Asn Pro Thr		
575	580	585
Leu Thr Ser Met Cys His Ala Ile Lys Ser Ala Arg Ser Ile Ile		
590	595	600
Asn Thr Leu Lys Gly Gly Thr Asp Gly Lys Asn Thr Gly Glu His		
605	610	615
Arg Asn Leu		
618		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lyophyllum shimeji

&lt;400&gt; 3

Asn Ala Glu Glu Gly Thr Ala Val Pro Tyr Val Pro Gly Tyr His

1

5

10

15

Lys Lys Asn Glu Ile Glu Phe Gln Lys Asp Ile Asp Arg Phe Val

20

25

30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lyophyllum shimeji

&lt;400&gt; 4

Glu Phe Asp Glu Ser Ile Arg His Thr Leu Val Leu Arg Ser Leu

1

5

10

15

Gln Asp Ala Tyr Lys Asp Arg Gln Arg

20

24

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lyophyllum shimeji

&lt;400&gt; 5

Ala Glu Arg Leu Ile Gly Thr Ser Thr Lys Glu Phe Asp Glu Ser

1	5	10	15
Ile	Arg	His	Thr
Leu	Val	Leu	Arg
Ser	Leu	Gln	Asp
Ala	Tyr		
	20	25	29

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> *Lyophyllum shimeji*

<400> 6

Ala	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Lys	Glu	Phe	Asp	Glu	Ser
1				5					10					15
Ile	Arg	His	Thr	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Ala	Tyr	Lys
				20					25					30

Asp Arg Gln Arg

34

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 9, 12, 15 and 18

<223> i represents inosine

<400> 7

gargarggia cigcigticc 20

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

garittycara argayathga ymg 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 6, 12 and 21

<223> i represents inosine

<400> 9

ttygtiaayg tiathtgygg igc 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 3 and 9

<223> i represents inosine



<400> 10

tgickdatis wytcrtrcraa ytc 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 3 and 15

<223> i represents inosine

<400> 11

tgickrtcyt trtaigcrtc ytg 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> 3, 12 and 18

<223> i represents inosine

<400> 12

ggigcraada tickytgick rtc 23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06404

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/375, C12N 15/31, 15/63, 1/21, C12Q 1/68, C12P 21/02, A01N 65/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 14/00-14/825, C12N 15/00-15/90, C12N 9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICST FILE (JOIS)  
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5712139, A (Kikkoman Corporation),	19
A	27 January, 1998 (27.01.98) & JP, 8-205861, A & DE, 19545780, A1	1-18, 20-27
A	JP, 10-313876, A (Natl Food Res. Inst.), 02 December, 1998 (02.12.98) (Family: none)	1-27
A	US, 5302699, A (Director of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 12 April, 1994 (12.04.94) & JP, 6-80699, A	1-27
A	OITA, S. et al., "Purification and Properties of a New Chitin-binding Antifungal CB-1 from Bacillus licheniformis.", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (March, 1996) Vol.60, No.3, pp.481-483	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 December, 2000 (11.12.00)

Date of mailing of the international search report  
19 December, 2000 (19.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 14/375, C12N 15/31, 15/63, 1/21, C12Q 1/68, C12P 21/02, A01N 65/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 14/00-14/825, C12N 15/00-15/90, C12N 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル (JOIS)  
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	US, 5712139, A (Kikkoman Corporation) 27. 1月. 1998 (27. 01. 98) & JP, 8-205861, A & DE, 19545780, A1	<u>19</u> 1-18, 20-27
A	JP, 10-313876, A (農林水産省食品総合研究所長) 2. 12月. 1998 (02. 12. 98) (ファミリーなし)	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5302699, A (Director of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries) 12. 4月. 1994(12. 04. 94) & JP, 6-80699, A	1-27
A	OITA, S. et al. "Purification and Properties of a New Chitin-bi nding Antifungal CB-1 from <i>Bacillus licheniformis</i> .", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (1996, Mar. ) Vol. 60, No. 3, p. 481-483	1-27